



(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

(12) **Offenlegungsschrift**
(10) **DE 198 19 889 A 1**

(51) Int. Cl. 6:
C 07 H 21/04

C 07 H 1/06
G 01 N 33/50
G 01 N 30/48
G 01 N 30/02
G 01 N 37/00

(21) Aktenzeichen: 198 19 889.2
(22) Anmeldetag: 4. 5. 98
(43) Offenlegungstag: 11. 11. 99

DE 198 19 889 A 1

(71) Anmelder:
Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der
angewandten Forschung e.V., 80636 München, DE

(74) Vertreter:
Gleiss & Große, Patentanwaltskanzlei, 70469
Stuttgart

(72) Erfinder:
Bernhagen, Jürgen, Dr., 72074 Tübingen, DE;
Brunner, Herwig, Prof. Dr., 70569 Stuttgart, DE; Eyb,
Hubertus, 72525 Münsingen, DE; Kisewetter,
Stefan, Dr., 73760 Ostfildern, DE; Koch-Pelster,
Brigitte, 71522 Backnang, DE; Tovar, Günter, Dr.,
70563 Stuttgart, DE

(56) Entgegenhaltungen:
US 56 50 489

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt
- (54) Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren
- (57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, wobei eine aus Zufallssequenzen bestehende DNA-Mischung zur Isolierung eingesetzt wird.

DE 198 19 889 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, insbesondere einem organischen oder anorganischen Material.

Die Isolierung von Nucleinsäuren aus bestimmten Ausgangsmaterialien spielt in einer Vielzahl von wissenschaftlichen, industriellen oder sonstigen Bereichen eine große Rolle. Derartige Bereiche sind zum Beispiel die Umweltanalytik, die Kriminaltechnik, die medizinische Diagnostik, die Grundlagenforschung oder ähnliches. Ebenso vielfältig wie die Anwendungsbereiche können die Ausgangsmaterialien für die Isolierung der Nucleinsäuren sein, beispielsweise eukaryontische oder prokaryontische Zellen oder deren Homogenate, Bodenproben, Blutproben, Körperflüssigkeiten oder Gewebehomogenate. In Abhängigkeit von diesem Ausgangs- oder Probenmaterial müssen unterschiedliche Aufschlußverfahren eingesetzt werden, um die beispielsweise in Zellen und/oder Zellkernen vorhandenen Nucleinsäuren einer Isolierung zugänglich zu machen. Häufig eingesetzte Aufschlußverfahren sind zum Beispiel die Ultraschall- und/oder Enzymbehandlung. Nach Durchführung der Aufschlußbehandlung werden die Nucleinsäuren beispielsweise mittels Gelektrophorese, Ultrazentrifugation oder Affinitätschromatographie isoliert.

Die Affinitätschromatographie beruht im wesentlichen auf der Fähigkeit von Nucleinsäuren, reversibel an positiv geladene und/oder positivpolare Matrices zu binden. In der Regel wird zunächst eine anionische oder polare Bindung der Nucleinsäuren an die Matrix erwirkt und anschließend die Nucleinsäure durch Einsatz geeigneter Lösemittel von Verunreinigungen befreit. In einem zweiten Schritt wird die an die Matrix gebundene Nucleinsäure unter Einsatz eines weiteren Lösemittels, beispielsweise mit höherer Ionenstärke, von der Matrix gelöst. Anschließend muß die so isolierte Nucleinsäure im allgemeinen wieder deionisiert werden, um für weitere Untersuchungen verwendet werden zu können.

Als nachteilig erweist sich dabei, daß je nach eingesetztem Probenmaterial und durchgeführtem Aufschlußverfahren unterschiedliche Isolierungsstrategien entwickelt und eingesetzt werden müssen.

Sowohl DNA als auch RNA wird herkömmlicherweise auch mittels Ultrazentrifugation isoliert, wobei häufig Protease- und Phenolbehandlungen durchgeführt werden müssen. Diese Verfahrensweise weist den Nachteil auf, daß insbesondere hochmolekulare DNA selbst nach Durchführung der Isolierung häufig noch mit Proteinen verunreinigt sind und die Moleküle aufgrund der einwirkenden Scherkräfte der Gefahr des Zerbrechens ausgesetzt sind. Zudem ist die Phenolbehandlung gesundheits- und umweltschädlich.

Auch die zur Nucleinsäureisolierung oftmals eingesetzte Gelektrophorese weist unter anderem aufgrund der notwendigen vergleichsweise umständlichen Vor- und Nachbehandlung der Proben beziehungsweise Nucleinsäuren Nachteile auf.

Das der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende technische Problem liegt also darin, ein kostengünstiges und einfaches durchzuführendes Isolierungsverfahren für Nucleinsäuren bereitzustellen, das aus beliebigem organischen und anorganischen Probenmaterial bereits während des Probenaufschlusses in einem einzigen Schritt hochspezifisch Nucleinsäuren in besonders reiner Form bereitstellt.

Die Erfindung löst dieses Problem durch die Bereitstellung eines Verfahrens zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, wobei eine immobilisierte nur aus Zufallssequenzen bestehende DNA-Mischung mit der Probe so in

Kontakt gebracht wird, daß eine Bindung beziehungsweise Hybridisierung von in der Probe vorhandenen Nucleinsäuren an die immobilisierte DNA-Mischung stattfinden kann und wobei die gebundenen Nucleinsäuren nach einem gegebenenfalls erfolgenden Waschschritt von der immobilisierten DNA-Mischung abgelöst werden.

Die Erfindung stellt also ein affinitätschromatographisches Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren bereit, bei dem in einer Probe enthaltene Nucleinsäuren mit einer immobilisierten, nur aus Zufallssequenzen bestehenden DNA-Mischung in Kontakt gebracht werden und diese DNA-Mischung spezifisch die in der Probe enthaltenen Nucleinsäuren, zum Beispiel DNA oder RNA, bindet und damit von den anderen Probenbestandteilen wie Kohlenhydraten, Fetten etc. isoliert. Die dabei einzuhaltenden Hybridisierungsbedingungen wie Temperatur und Pufferzusammensetzung hängen von der jeweiligen konkreten Isolieraufgabe ab.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer nur aus Zufallssequenzen bestehenden DNA-Mischung eine Mischung aus DNA-Zufallssequenzen, die auch als random primers bezeichnet werden, verstanden, die nicht spezifisch auf eine konkret zu isolierende Nucleinsäure zusammengestellt ist, sondern jede beliebige Nucleotidpermutation aufweist, so daß unterschiedslos alle in der Probe vorhandenen Nucleinsäuren mit für eine Hybridisierung ausreichende Kettenlänge gebunden werden. Die DNA-Zufallssequenzen weisen eine im wesentlichen einheitliche, aber beliebige Kettenlänge auf, vorzugsweise eine durchschnittliche Kettenlänge von 10. Die nur aus Zufallssequenzen bestehende DNA-Mischung weist also eine Vielzahl von unterschiedlichen DNA-Molekülen in Einzelstrangform auf, deren Sequenz jeweils zufällig zusammengesetzt ist.

Bei der Herstellung dieser DNA-Mischung wird so vorgegangen, daß im Verlauf der DNA-Synthese die vier am DNA-Aufbau beteiligten Nucleoside, das heißt Desoxyadenosin, Desoxyguanosin, Desoxycytidin und Desoxythymidin sowie gegebenenfalls deren jeweilige Synthone, das heißt deren strukturanaologe Modifikationen, pro DNA-Kettenverlängerungsschritt in einem Mischungsverhältnis von 1 : 1 : 1 : 1 eingesetzt werden. Das hat zur Folge, daß je Position in einer DNA-Molekülkette alle vier Nucleoside mit gleicher Wahrscheinlichkeit eingebaut werden. Eine DNA-Mischung mit DNA-Zufallssequenzen von jeweils beispielsweise 10 Nukleotiden Länge, dargestellt durch die Abfolge 5'NNNNNNNNN'3', wobei N für Desoxyadenosin, Desoxyguanosin, Desoxythymidin und Desoxycytidin steht, repräsentiert demnach eine Mischung aller einzelsträngiger DNA-Moleküle mit einer Kettenlänge von 10 Nukleotiden, das heißt 4^{10} verschiedene DNA-Moleküle. Die Anzahl von unterschiedlichen DNA-Zufallssequenzen pro erfundsgemäßer DNA-Mischung beträgt demnach 4^x , wobei x die Kettenlänge oder Nucleotidanzahl der DNA-Zufallssequenz ist.

In besonders vorteilhafter Ausgestaltung der Erfindung betrifft die Erfindung ein vorgenanntes Verfahren, wobei die in der DNA-Mischung vorhandenen 4^x Zufallssequenzen in gleichen, vorzugsweise in im wesentlichen, molaren Mengenanteilen vorkommen. Die erfundsgemäß eingesetzte DNA-Mischung ist also nicht im Hinblick auf eine konkrete Isolieraufgabe hin entwickelt, sondern stellt vielmehr eine für jede beliebige DNA- oder RNA-Isolieraufgabe einsetzbare DNA-Mischung ohne jegliche konkrete DNA- oder RNA-Spezifität dar. Die eingesetzte DNA-Mischung ist nur insoweit spezifisch, als daß sie Nucleinsäuren, das heißt DNA oder RNA, von anderen Stoffen wie zum Beispiel Proteinen, Zuckern oder ähnlichem trennen kann. Erfundsgemäß kann jedoch vorgesehen sein, durch geeignete Auswahl der Bindungsweise Hybridisierungsbedin-

gungen zwischen zu isolierender Nucleinsäure und DNA-Mischung oder der Lösebedingungen (Temperatur, Ionenstärke etc.) DNA von RNA zu unterscheiden. Das erfundungsgemäße Verfahren kann also in vorteilhafter Weise DNA oder RNA-spezifisch durchgeführt werden.

Selbstverständlich kann die erfundungsgemäß einzusetzende DNA-Mischung auch andere Nucleoside wie Desoxyinosin, Uridin, Pseudouridin, N²-Dimethylguanosin, N⁶-Isopentenyladenosin enthalten. Erfundungsgemäß kann auch vorgesehen sein, anstelle der Desoxyribosederivate, Ribosederivate, also RNA-Bausteine einzusetzen. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer DNA-Mischung gegebenenfalls also auch eine RNA-Mischung verstanden.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer Probe jedes beliebige organische, anorganische oder organisch/anorganisches Material verstanden, sofern dieses eine Nucleinsäure, also DNA oder RNA, enthält. Eine Probe kann demgemäß eine prokaryotische oder eukaryotische Zelle oder ein Zellhomogenat, eine Virussuspension, Blut, Sperma, Lymph- oder sonstige Körperfüssigkeit, Organ- oder Gewebepräparat, Wasser- oder Bodenproben, Pflanzenhomogenate, Bernstein oder sonstiges sein.

Die Erfindung weist den Vorteil auf, daß aus einer Probe bereits während des Probenaufschlusses in einem einzigen Schritt hochspezifisch Nucleinsäuren isoliert werden können und in reiner Form erhalten werden, so daß diese direkt für andere Analyse- oder Präparationschritte, wie beispielsweise ein PCR-Verfahren, eingesetzt werden können. Die erfundungsgemäße Vorgehensweise setzt in vorteilhafter Weise keine kosten- und zeitintensiven Anpassungsschritte des Verfahrens an die jeweilige Isolieraufgabe voraus. Vielmehr kann das erfundungsgemäße Verfahren direkt ohne weitere Modifikation für jede beliebige Isolieraufgabe eingesetzt werden. So kann das erfundungsgemäße Verfahren im Verlauf nahezu jeden chemischen, physikalischen oder chemisch-physikalischen Aufschlusses organischen oder anorganischen Materials eingesetzt werden.

In besonders vorteilhafter Weise kann vorgesehen sein, die mit der immobilisierten, nur aus Zufallssequenzen bestehenden DNA-Mischung in Kontakt gebrachte Probe Ultraschalleinfluß, beispielsweise bei 20 bis 30 kHz, auszusetzen, um einen Probenaufschluß, insbesondere Zellaufschluß, zu erreichen. Dies führt gleichzeitig zu einer Erwärmung des Reaktionsgemisches aus Probe und immobilisierter DNA-Mischung, so daß die in der Probe enthaltende DNA denaturiert wird und beim Abkühlen an die immobilisierte DNA-Mischung binden kann.

In besonders bevorzugter Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, daß nach der Affinitätsbindung der in der Probe vorhandenen Nucleinsäuren an die DNA-Mischung Verunreinigungen mittels geeigneter Pufferlösungen oder Wasser entfernt werden. Nach dem erfolgten Waschschritt kann die affinitätsgebundene Nucleinsäure durch Erhöhung der Umgebungstemperatur, beispielsweise auf mindestens 70°C, zum Beispiel Siedetemperatur, in Gegenwart eines geeigneten Lösemittels, zum Beispiel einer Pufferlösung oder Wasser, von der DNA-Mischung abgelöst werden. Die Ablösung kann auch durch Erhöhung der Ionenstärke des Lösepuffers oder eine Veränderung des pH-Wertes erfolgen. Die erhaltene Nucleinsäure ist frei von Verunreinigungen und kann insbesondere durch PCR-Verfahren, auch in Gegenwart der immobilisierten DNA-Mischung, amplifiziert werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine Vorrichtung, insbesondere eine Affinitätsmatrix, zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, insbesondere zur Durchführung eines vorgenannten Verfahrens, umfassend eine nur aus Zu-

fallssequenzen bestehende, vorstehend beschriebene, DNA-Mischung, die an einer Matrix immobilisiert ist. Die Erfindung sieht also eine Vorrichtung, insbesondere eine Affinitätsmatrix, vor, mit Hilfe derer das vorgenannte Verfahren durchgeführt werden kann, insbesondere mit Hilfe derer Nucleinsäuren aus einer beliebigen Probe in einfacher und kostengünstiger Weise isoliert werden können.

Die erfundungsgemäße Vorrichtung umfaßt eine Matrix, die beispielsweise als Membran, als Kugelchen (beads) oder Säulengel ausgeführt sein kann und als Träger oder Grundgerüst für die nur aus Zufallssequenzen bestehende DNA-Mischung fungiert. Es kann auch vorgesehen sein, magnetische Partikel, zum Beispiel Kugelchen, als Matrix einzusetzen.

Die Erfindung sieht in vorteilhafter Weise vor, als Material für die Matrix ein chemisch und physikalisch weitgehend inertes Material einzusetzen, wie Glas oder Kunststoff, zum Beispiel Polystyrol oder Polypropylen.

Insbesondere muß das Material geeignet sein, Temperaturunterschiede in einem Intervall zwischen 10°C und 90°C, pH-Unterschiede in einem Intervall zwischen 0 bis 14 und Natrium- beziehungsweise Calciumchloridionenkonzentrationen in einem Intervall von 10 mM bis 2 M ohne Veränderung der Materialeigenschaften zu tolerieren. Darüber hinaus muß das eingesetzte Material unlöslich in Wasser Detergentien und Tensidmischungen sowie chemisch inert gegenüber chaotropen Reagenzien, wie zum Beispiel Isoguanidinthiocyanat, sein.

Die Matrix ist in vorteilhafter Weise auf ihrer Oberfläche modifiziert, beispielsweise durch das Aufbringen von Biomolekülen, die hochaffin an der Oberfläche des Matrixmaterials binden. Ein derartiges auf der Matrix immobilisiertes Biomolekül kann zum Beispiel Streptavidin sein. Die Matrixoberfläche kann jedoch auch derart modifiziert sein, daß eine kovalente Bindung zwischen den Zufallssequenzen der DNA-Mischung und der Matrix ermöglicht wird. Demgemäß kann die Matrix Aminogruppen aufweisen, die über einen Dialdehydspace beziehungsweise ein Dialdehydverbindungs molekül, zum Beispiel Glutardialdehyd, unter Bildung einer Schiff'schen Base mit einer zum Beispiel am 5'-Ende der DNA-Zufallssequenzen eingeführten Aminofunktion eine Bindung eingehen kann. Erfundungsgemäß kann vorgesehen sein, die Matrix vor Modifizierung ihrer Oberfläche zu reinigen, zum Beispiel mit Salpetersäure. Zudem sieht die Erfindung in vorteilhafter Ausführungsform vor, die Oberfläche der Matrix vor der Modifizierung zu silanieren.

Die Zufallssequenzen der DNA-Mischung weisen demgemäß zum Zweck der Immobilisierung an der Matrix ebenfalls Modifikationen, vorzugsweise am 5'-Ende, auf. Derartige Modifikationen können beispielsweise mit dem 5'-Ende der DNA-Zufallssequenz verbundene Biomoleküle wie Biotin sein, die hochaffin an auf der Matrix immobilisierte andere Biomoleküle binden, wie beispielsweise Streptavidin. Es kann auch vorgesehen sein, Aminofunktionen in die DNA-Zufallssequenzen einzuführen, so daß diese unter Bildung einer Schiff'schen Base mit an der Matrix immobilisierten Aldehydgruppen kovalent binden können.

In jedem Fall werden die modifizierten DNA-Zufallssequenzen in Einzelstrangform, also die DNA-Mischung, und die modifizierten Matrix miteinander in Kontakt gebracht, so daß die DNA-Mischung an der Matrix immobilisiert wird. Die mit der erfundungsgemäß einzusetzenden DNA-Mischung beladene Matrix wird im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung auch als Affinitätsmatrix bezeichnet.

Die erfundungsgemäße Vorrichtung oder Affinitätsmatrix kann in vorteilhafter Weise auch auf der Oberfläche von Par-

tikeln aufgebracht werden, die im Rahmen eines Aufschlusses dem Aufschluß zu- beziehungsweise ausgesetzt werden.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung einer nur aus Zufallssequenzen bestehenden DNA-Mischung, insbesondere einer gleichteiligen Mischung, aus 4^x verschiedenen DNA-Zufallssequenzen, wobei x gleich der Kettenlänge der DNA-Zufallssequenz ist, vorzugsweise 10, zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe.

Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Die Erfindung wird anhand von Ausführungsbeispielen und dazugehöriger Figuren näher erläutert.

Die Figuren zeigen:

Fig. 1 eine Matrix einer erfundungsgemäßen Vorrichtung,

Fig. 2 eine erfundungsgemäße Vorrichtung beziehungsweise DNA-Affinitätsmatrix,

Fig. 3 ein Elektropherogramm und

Fig. 4 zwei Chromatogramme der Bindung von Standard-DNA an unbehandelte und behandelte Glasperlen.

Beispiel 1

Vorrichtung zur DNA-Isolierung

Die Fig. 1 zeigt eine Matrix 10, die in Form einer Membran 1 ausgeführt ist. Die Membran 1 ist auf ihrer Oberfläche mit Streptavidinmolekülen 3 beschichtet.

Die Fig. 2 stellt eine Affinitätsmatrix 100 dar, die hergestellt wurde, indem die Matrix 10 mit 5 modifizierten chemisch oder synthetisch hergestellten DNA-Zufallssequenzen 7, 7, 7" einer DNA-Mischung in Einzelstrangform in Kontakt gebracht wurde, wobei die 5-Modifikation der DNA-Zufallssequenz diese in die Lage versetzt, hochaffin an die Streptavidinmoleküle 3 zu binden. Die Fig. 2 stellt dar, daß die 5'-Enden der DNA-Zufallssequenzen 7, 7, 7" jeweils an Biotin 5 gebunden sind. Die Biotinmodifikation am 5'-Ende der DNA-Zufallssequenzen 7, 7, 7" bindet hochaffin an die immobilisierten Streptavidinmoleküle 3, so daß eine auf einer Matrix 10 immobilisierte DNA-Mischung mit den einzelnen DNA-Zufallssequenzen 7, 7, 7" gebildet wird.

Beispiel 2

Isolierung von DNA aus einem Zellaufschluß

A) Herstellung der Affinitätsmatrix

Für die Versuche wurden Ballotini Micro-Glaskugeln Typ 3000 der Firma Potters-Ballotini GmbH, Kirchheimbolanden verwendet. Ihre Größe war mit bis zu 50 μm angegeben. Um das Ausgangsmaterial zu reinigen und die Oberfläche für die Silanisierung vorzubereiten, wurden die Glaskügelchen in Salpetersäure gekocht. 50 g der Glaskügelchen wurden in einen 1-l-Dreihalskolben mit Rücklaufkühler zu 500 ml circa 7%iger Salpetersäure gegeben. Über einen Heizpilz wurde bis zum Sieden erhitzt und 1 Stunde unter Rückfluß gekocht. Währenddessen wurde über einen Magnetrührer mit Rührfisch gerührt. Nach dem Erkalten wurde die überstehende Flüssigkeit abdekantiert. Die Glaskügelchen wurden dreimal mit Wasser in MilliQ-Qualität gewaschen und über eine Nutsche abfiltriert. Bei 95°C wurden sie über Nacht im Trockenschrank getrocknet. Da nach dem Trocknen mit bloßem Auge noch Verunreinigungen zu erkennen waren, wurde der gesamte Reinigungsvorgang nochmals wiederholt.

10 g der trockenen und gereinigten Glaskügelchen wurden zu 200 ml trockenem Methanol in einen 250 ml Ein-

hals-Rundkolben gegeben. Der Kolben wurde mit Argon gespült. Es wurden 20 ml 3-Aminopropyltrimethoxsilan (Fluka) zugegeben. Als Katalysator wurden 0,5 ml Triethylamin zugesetzt. Der Ansatz wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde abdekantiert und die Glaskügelchen mit Wasser (MilliQ) gewaschen und über eine Nutsche abfiltriert.

Zunächst wurde aus 160 ml 0,1 M K_2HPO_4 und 40 ml 0,1 M KH_2PO_4 ein Kaliumphosphatpuffer hergestellt und auf pH 7,5 eingestellt. Aus 10 ml 25%iger Glutardialdehyd-Lösung und 90 ml des Kaliumphosphatpuffers wurde eine 2,5%ige Glutardialdehyd-Lösung hergestellt. Zu 40 ml der 2,5%igen Glutardialdehyd-Lösung wurden 4 g der silanierten Glaskügelchen zugegeben und circa 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Glaskügelchen wurden anschließend mit Wasser, Kaliumphosphatpuffer und wieder gut mit Wasser gewaschen.

Oligonukleotide (1 μmol pro Ansatz) (15-mer, jedes 15-mer in gleicher Konzentration, das heißt, es liegt eine Verteilung sämtlicher theoretisch möglicher Oligomere mit den Nucleotiden A, T, G und C in jeweils gleichen Anteilen vor, Firma Interactiva, Ulm, Deutschland) wurden in 1 ml Kaliumphosphatpuffer aufgenommen. In einem 15 ml Röhrchen (Greiner GmbH) wurde zu 4 ml Kaliumphosphatpuffer 1 g der silanierten und mit Glutardialdehyd aktivierten Glaskügelchen sowie 1 ml der Primer-Lösung zugegeben. Der Ansatz wurde kurz in Eis gekühlt. Über Nacht wurde das Röhrchen im Kühlraum auf einen Roller gelegt und dort 17 Stunden gerollt. Die Glaskügelchen wurden in einer Minifuge (Heraeus) 5 Minuten bei 1500 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und zunächst im Kühlschrank aufbewahrt. Das Pellet wurde dreimal in circa 6 ml Kaliumphosphatpuffer aufgenommen und abzentrifugiert, um ungegebundene Primer auszuwaschen. Die Kugelchen wurden mit Wasser (MilliQ) aufgeschlemmt und je zur Hälfte in zwei Eppendorfhüttchen gegeben. Die eine Hälfte wurde so eingefroren, die andere Hälfte wurde in 3 Durchgängen zu je 10 Minuten in der Speedvac getrocknet und ebenfalls im Gefrierschrank gelagert. Um abschätzen zu können, ob tatsächlich Primer gebunden wurden, wurden von der Primer-Stammlösung und vom Überstand nach dem Anfügen UV-Spektren bei 260 nm aufgenommen. Aus den Spektren wurde die jeweilige Primer-Konzentration ermittelt.

B) Zellaufschluß und DNA-Isolierung

In einem Reaktionsgefäß wurden 10^2 bis 10^9 der aufzuschließenden Zellen in 0,05 bis 1 ml eines Puffers der Zusammensetzung 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 und 8,1 mM Na_2HPO_4 , pH = 7,0, vorgelegt. Anschließend wurden 50 bis 500 mg der Oligonukleotidbeschichteten Affinitätsperlen zugegeben. Zum Aufschluß der Zellen wurde in die entstehende Mischung Ultraschall der Frequenz 20 bis 30 kHz über einen Becherresonator eingeschaltet. Das Reaktionsgemisch erwärme sich dabei auf durchschnittlich 80°C, was ausreichte, die freigesetzte doppelsträngige DNA zu denaturieren, so daß sie beim Abkühlen der Reaktionsmischung durch Hybridisierung an die Affinitätsmatrix zu binden vermochte. Durch Unterschichten des Reaktionsgemisches mit Chloroform wurde eine Phasentrennung herbeigeführt, wobei sich die Glasperlen, aufgrund ihres hohen spezifischen Gewichtes in der Chloroformphase anreicherten. Der wäßrige Überstand, der neben Zelltrümmern alle wasserlöslichen Bestandteile des Zellaufschlusses enthält, wurde abgenommen und die Glasperlen, denen die zu isolierende DNA anhaftete, im Vakuum getrocknet.

Wurde die Isolierung der DNA an Dynabeads durchgeführt, wurden 50 µl Zellysat mit 50 µl konjugierten Dynabeads der Konzentration 5 mg/ml in einem Puffer der Zusammensetzung 20 mM Tris/HCl pH = 7,5, 1 M LiCl, 2 mM EDTA, versetzt. Das resultierende Gemisch inkubierte hier für 10 Minuten auf einem Roller und für weitere 10 Minuten im Stehen. Die mit DNA beladenen Partikel wurden magnetisch separiert und zweimal mit je 100 µl Waschpuffer nach Herstellerangaben gewaschen.

10

C) Elution von DNA von der Affinitätsmatrix

Die DNA enthaltenden Affinitätsmatrices wurden wahlweise in Wasser oder einem Puffer der Zusammensetzung 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH = 8,0 aufgewärmt. Die resultierende Suspension wurde 10 Minuten zum Sieden erhitzt, wobei sich die an die Affinitätsmatrix gebundene DNA löste und mit dem Überstand, in der Hitze, abgenommen werden konnte.

15

Beispiel 3

DNA-Isolierung und PCR

In einem ersten Experiment wurde die prinzipielle Durchführbarkeit der Isolierung von DNA an immobilisierten DNA-Zufallssequenzen (15-mer, wie in Beispiel 2) gezeigt. Dazu wurden am 5'-Ende biotinylierte DNA-Zufallssequenzen an kommerziell erhältliche Streptavidin beschichtete magnetische Partikel immobilisiert und ihre DNA-Bindungseigenschaften mit den Bindungseigenschaften eines kommerziell erhältlichen DNA-Isolierungssystems (DYNAL Direct) verglichen. Als Referenz-DNA diente ein das MIF-Gen enthaltendes Plasmid, das aus intakten Escherichia coli Zellen durch chemischen Zellaufschluß freigesetzt wird. Nach der Plasmid-Isolierung wurde das MIF-Gen mit einem geeigneten Sondenpaar amplifiziert und die PCR-Produkte elektrophoretisch getrennt. Die Ergebnisse dieser Vergleichsuntersuchungen sind in Fig. 3 dargestellt. Die Bahnen 3 und 4 des Elektropherogramms repräsentieren das MIF-PCR-Produkt von Plasmid-DNA, die an DNA-Zufallssequenzen isoliert werden konnte. Dem sind in den Bahnen 5 und 6 die MIF-PCR-Produkte der mit Hilfe des kommerziellen Systems isolierten Plasmid-DNA gegenübergestellt. Es zeigt sich weder ein qualitativer, noch ein quantitativer Unterschied zwischen beiden Isolierungsstrategien.

20

Beispiel 3

DNA-Isolierung und PCR

In einem ersten Experiment wurde die prinzipielle Durchführbarkeit der Isolierung von DNA an immobilisierten DNA-Zufallssequenzen (15-mer, wie in Beispiel 2) gezeigt. Dazu wurden am 5'-Ende biotinylierte DNA-Zufallssequenzen an kommerziell erhältliche Streptavidin beschichtete magnetische Partikel immobilisiert und ihre DNA-Bindungseigenschaften mit den Bindungseigenschaften eines kommerziell erhältlichen DNA-Isolierungssystems (DYNAL Direct) verglichen. Als Referenz-DNA diente ein das MIF-Gen enthaltendes Plasmid, das aus intakten Escherichia coli Zellen durch chemischen Zellaufschluß freigesetzt wird. Nach der Plasmid-Isolierung wurde das MIF-Gen mit einem geeigneten Sondenpaar amplifiziert und die PCR-Produkte elektrophoretisch getrennt. Die Ergebnisse dieser Vergleichsuntersuchungen sind in Fig. 3 dargestellt. Die Bahnen 3 und 4 des Elektropherogramms repräsentieren das MIF-PCR-Produkt von Plasmid-DNA, die an DNA-Zufallssequenzen isoliert werden konnte. Dem sind in den Bahnen 5 und 6 die MIF-PCR-Produkte der mit Hilfe des kommerziellen Systems isolierten Plasmid-DNA gegenübergestellt. Es zeigt sich weder ein qualitativer, noch ein quantitativer Unterschied zwischen beiden Isolierungsstrategien.

Beispiel 4

50

Affinitätschromatographie

Die als Affinitätsmatrix zur DNA-Isolierung hergestellten Glasperlen nach Beispiel 2 wurden in eine HPLC-Leersäule übergeführt und dort auf ihre DNA-Bindungskapazität untersucht. Ein wesentlicher Vorteil säulenchromatographischer Verfahren gegenüber sogenannten Batch-Verfahren ist ihre hohe Reproduzierbarkeit und die Möglichkeit, die Versuchsbedingungen (Flußrate, Laufmittel, Temperatur) auf einfache Weise variieren zu können. Die Fig. 4 stellt Chromatogramme der Bindung von Standard-DNA (jeweils 25 µg) bei 50°C und einem Puffer der Zusammensetzung 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH = 8,0 an unbehandelte Glasperlen und an Glasperlen mit immobilisierten DNA-Zufallssequenzen dar. Die Differenz der Flächen unter den Kurven (Kurve 1: Glasperlen ohne DNA-Zufallssequenz; Kurve 2: Glasperlen mit DNA-Zufallssequenz) entspricht der DNA-Bindungskapazität der Affinitätsmatrix.

Die Flußrate betrug jeweils 0,1 ml/min. Unter den gewählten Bedingungen zeigte sich (vgl. Fig. 4), daß die DNA-Bindungskapazität der mit Zufallssequenzen beschichteten Glasperlen die Bindungskapazität unbeschichteter Glasperlen um das 7,16 fache übertraf.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, wobei eine immobilisierte, nur aus Zufallssequenzen bestehende DNA-Mischung mit der Probe so in Kontakt gebracht wird, daß eine Bindung von in der Probe vorhandenen Nucleinsäuren an die immobilisierte DNA-Mischung stattfinden kann und wobei die gebundenen Nucleinsäuren nach einem gegebenenfalls erfolgenden Waschschritt von der immobilisierten DNA-Mischung abgelöst werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die immobilisierte, nur aus Zufallssequenzen bestehende DNA-Mischung unter Einfluß einer Ultraschallbehandlung mit der Probe in Kontakt gebracht wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die gebundenen Nucleinsäuren durch Erhöhung der Temperatur, insbesondere auf 70°C, in Gegenwart eines Lösemittels abgelöst werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Lösemittel, das Waschmittel oder beides Wasser oder eine Pufferlösung ist.
5. Vorrichtung zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, insbesondere zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 4, umfassend eine nur aus Zufallssequenzen (7, 7', 7'') bestehende DNA-Mischung, die an einer Matrix (10) immobilisiert ist.
6. Vorrichtung nach Anspruch 5, wobei die DNA-Mischung 4^x verschiedene DNA-Zufallssequenzen (7, 7', 7'') aufweist, mit x gleich der Anzahl der Nucleotide pro DNA-Zufallssequenz, vorzugsweise mit x gleich 10.
7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 5 oder 6, wobei in der DNA-Mischung die Zufallssequenzen (7, 7', 7'') zu, vorzugsweise im wesentlichen, gleichen Anteilen vorhanden sind.
8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 5 bis 7, wobei jede Zufallssequenz (7, 7', 7'') am 5'-Ende modifiziert, insbesondere biotinyliert, ist.
9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 5 bis 8, wobei jede einzelne DNA-Zufallssequenz (7, 7', 7'') am 5'-Ende eine Aminogruppe aufweist.
10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 5 bis 9, wobei die Oberfläche der Matrix (10) immobilisierte Biomoleküle (3) zur Bindung der DNA-Mischung aufweist, insbesondere Streptavidin.
11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 5 bis 9, wobei die Oberfläche der Matrix (10) Aminogruppen aufweist, an die Dialdehydgruppen gebunden sind.
12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 5 bis 11, wobei die Matrix (10) als Membran (1) oder Säulengel ausgeführt ist.
13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 5 bis 12, wobei die Vorrichtung auf der Oberfläche von Partikeln aufgebracht ist.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

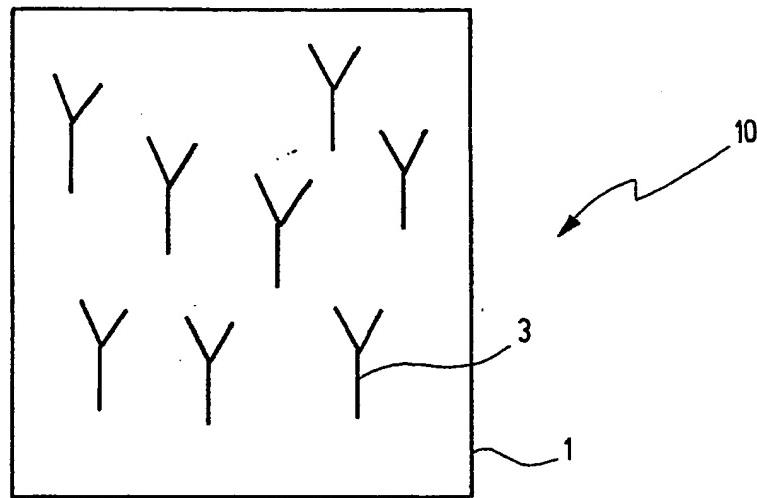


Fig. 1

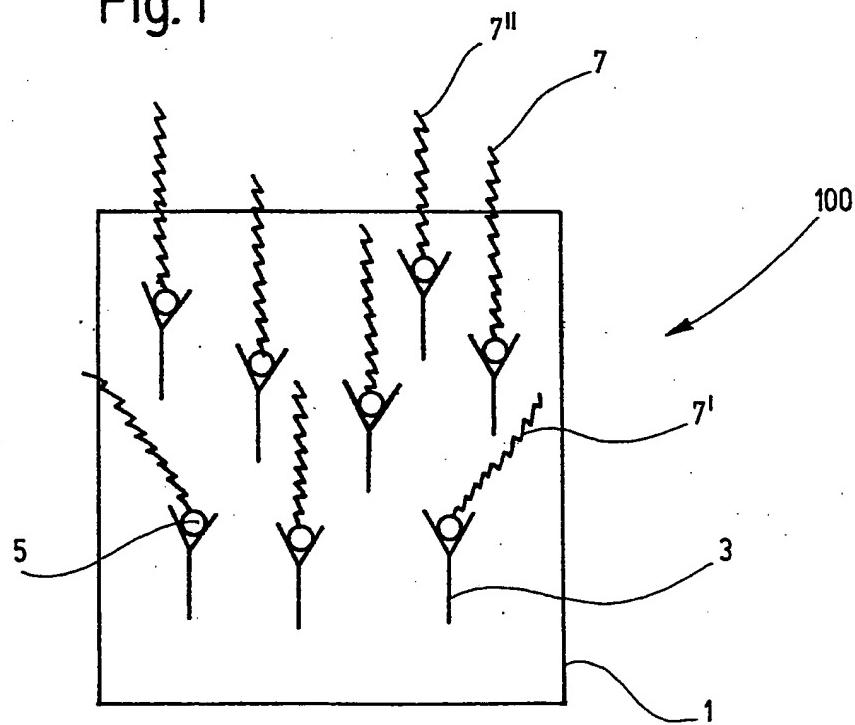


Fig. 2

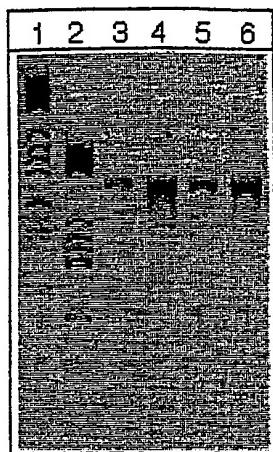


Fig. 3

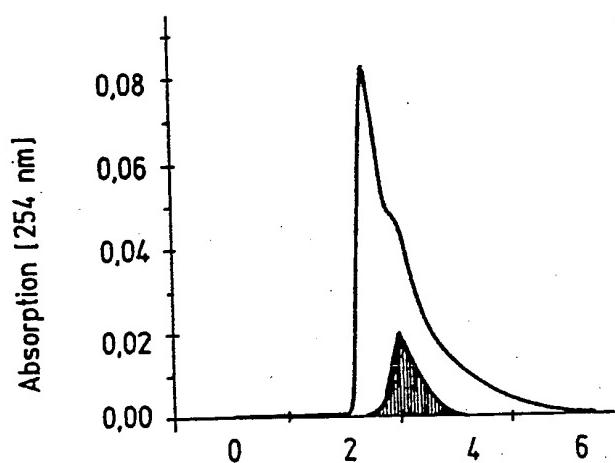


Fig. 4

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)